

- For more records, click the Records link at page end.
- To change the format of selected records, select format and click Display Selected.
- To print/save clean copies of selected records from browser click Print/Save Selected.
- To have records sent as hardcopy or via email, click Send Results.

<input checked="" type="checkbox"/> Select All	<input type="checkbox"/> Clear Selections	Print/Save Selected	Send Results	Format
Display Selected				<input type="checkbox"/> Free

1. 2/5/1

010316708

WPI Acc No: 1995-217966/199529

XRAM Acc No: C95-100707

XRPX Acc No: N95-170803

Prepn. of support for immunoassay and support with
non-specific adsorption reduced - by covering surface of insoluble
substrate of specific size and shape with poly-lysine, through
non-covalent bonding

Patent Assignee: TOSOH CORP (TOYJ)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 7128336	A	19950519	JP 93271842	A	19931029	199529 B

Priority Applications (No Type Date): JP 93271842 A 19931029

Patent Details:

Patent No Kind Lan Pg Main IPC Filing Notes

JP 7128336 A 3 G01N-033/543

Abstract (Basic): JP 7128336 A

New prepn. of supports for immunoassay comprises covering the
surface of an insoluble substrate of a desired size and a desired shape
with poly-lysine through non-covalent bonding.

Also claimed is a prepn. comprising covering the surface of the
substrate with poly-lysine through non-covalent binding and subjecting
the resultant prod. to blocking treatment in which a protein(s)
practically non involved in immunological reaction is bonded to the
prod..

ADVANTAGE - To provide supports with non-specific adsorption
reduced.

Dwg. 0/0

Title Terms: PREPARATION; SUPPORT; IMMUNOASSAY; SUPPORT; NON; SPECIFIC;
ADSORB; REDUCE; COVER; SURFACE; INSOLUBLE; SUBSTRATE; SPECIFIC; SIZE;
SHAPE; POLY; LYSINE; THROUGH; NON; COVALENT; BOND

Derwent Class: B04; D16; J04; S03

International Patent Class (Main): G01N-033/543

File Segment: CPI; EPI

Derwent WPI (Dialog® File 352): (c) 2001 Derwent Info Ltd. All rights reserved.

<input checked="" type="checkbox"/> Select All	<input type="checkbox"/> Clear Selections	Print/Save Selected	Send Results	Format
Display Selected				<input type="checkbox"/> Free

© 2001 The Dialog Corporation plc

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-128336

(43) 公開日 平成7年(1995)5月19日

(51) Int.Cl.⁶
G 01 N 33/543

識別記号
5 2 5 U 9217-2 J
G 9217-2 J

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数4 OL (全3頁)

(21) 出願番号 特願平5-271842

(22) 出願日 平成5年(1993)10月29日

(71) 出願人 000003300

東ソー株式会社

山口県新南陽市開成町4560番地

(72) 発明者 太田 勝之

神奈川県相模原市相模台1-22-16-102

(72) 発明者 森本 康一

神奈川県藤沢市湘南台4丁目26番地5号

(54) 【発明の名称】 免疫測定用担体を製造する方法及び免疫測定用担体

(57) 【要約】

【目的】 非特異的吸着が低減された免疫測定用担体、該担体の製造方法を提供する。

【構成】 任意の大きさ、形状の不溶性物質の表面にポリリジンを非共有結合させて該表面を覆うことを特徴とする免疫測定用担体を製造する方法又は表面に非共有結合により結合したポリリジンの被覆層を有する免疫測定用担体等により、前記目的を達成する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 任意の大きさ、形状の不溶性物質の表面にポリリジンを非共有結合させて該表面を覆うことを特徴とする免疫測定用担体を製造する方法。

【請求項2】 任意の大きさ、形状の不溶性物質の表面にポリリジンを非共有結合させて該表面を覆い、更に免疫反応には実質的に関与しない蛋白質を結合させるブロッキング処理を施すことを特徴とする免疫測定用担体を製造する方法。

【請求項3】 免疫反応には実質的に関与しない蛋白質としてウシ血清アルブミンを使用する請求項2の免疫測定用担体を製造する方法。

【請求項4】 表面に非共有結合により結合したポリリジンの被覆層を有する免疫測定用担体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、免疫測定用担体の改良された製造方法及び免疫測定用担体に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 血清、尿等の生体試料中の微量物質の検出には、例えば抗体を固定化した担体と、標識物質を結合した抗体を用いたサンドイッチエンザイムノアッセイ等の免疫測定を行うことが多い。これらの免疫測定を実施するために、抗原や抗体を固定化するための不溶性の担体を用いることがあり、従来、プラスチック等の高分子担体が安価で簡便なことから多用されている。

【0003】 これら高分子担体では、抗体又は抗原を直接又は間接に結合させた後、更にブロッキング操作を行うことにより、測定する目的物質非存在下での検出可能な標識物質と結合した免疫学的に活性な物質（コンジュゲート、以下単に標識物質という）の担体への非特異的吸着を再現性良く低減し得ることが知られており、高感度な免疫測定が実施できる。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 従来の免疫測定用担体では、高分子等の担体に直接抗原又は抗体を結合させた後、更に免疫反応に実質的に関与しない蛋白質等を用いたブロッキング処理を行うことにより、免疫反応の際に生じる標識物質の担体への非特異的結合を低減させていた。しかし、特に担体それ自体が非特異的吸着をおこす性質を有している場合等は、従来のブロッキング処理のみでは、免疫測定中にブロッキング剤が剥離する等した場合、標識物質の非特異的結合を十分に抑えきれない。

【0005】

【課題を解決するための手段】 免疫測定の感度を向上させるためには、標識物質の担体への非特異的吸着を抑制することが必要であるが、本発明者らは、担体表面をポリリジンで被覆することにより標識物質の非特異的吸着を抑制し得ることを見出だし本発明を完成させた。

【0006】 即ち本発明は、任意の大きさ、形状の不溶性物質の表面にポリリジンを共有又は非共有結合させて該表面を覆うことを特徴とする免疫測定用担体を製造する方法又は任意の大きさ、形状の不溶性物質の表面にポリリジンを共有又は非共有結合させて該表面を覆い、更に免疫反応には実質的に関与しない蛋白質を結合させるブロッキング処理を施すことを特徴とする免疫測定用担体を製造する方法である。

【0007】 更に本発明は、表面に非共有結合により結合したポリリジンの被覆層を有する免疫測定用担体である。以下本発明を詳細に説明する。

【0008】 本発明は、免疫測定で用いられる検出可能な標識物質、即ち標識物質と抗体や抗原等の結合体の担体への非特異的吸着を抑制するためになされたものである。ここで標識物質とは、¹³¹I、¹²⁵I、⁵⁷Co、³²P、¹⁴C、³H等の放射性同位元素、アルカリ性フォスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ等の酵素、FITC等の蛍光物質の他、発光物質、吸光物質等の一般に免疫測定に使用される標識物質を意味する。

【0009】 本発明の免疫測定用担体を製造する方法は、担体に直接又は間接に抗原や抗体を結合させるのではなく、まず、ポリリジンを共有又は非共有結合させて担体表面を被覆することで、担体自体がもつ非特異的結合をおこす担体表面の性質を改善させることを特徴とする。

【0010】 本発明で用いられる担体は、ポリリジンを結合できれば特に制限はなく、例えばポリスチレン、塩化ビニル樹脂、エチレン酢酸ビニル共重合体等の樹脂、アルミナ、金属、金属酸化物等の無機物を例示できる。

【0011】 担体の大きさや形状にも制限はなく、任意の大きさや形状を選択できるが、表面積が大きく、かつ反応容器との接地面積が均一で最小である等の理由から、特に球状が好ましい。

【0012】 ポリリジンを担体に結合させた後、免疫反応には実質的に関与しない蛋白質を用いてブロッキング処理を行うと、更に非特異的吸着の低い担体を得ることができる。ここで用いる、免疫反応には実質的に関与しない蛋白質等としては、例えばウシ血清アルブミン、ゼラチン、カゼイン又はそれらの分解物等を例示することができるが、これら蛋白に限定されない。

【0013】 本発明はまた、任意の大きさ、形状の不溶性担体の表面に共有又は非共有結合により結合したポリリジンを介して免疫学的に活性な物質が結合されている免疫測定用担体をも提供する。担体に結合される免疫学的に活性な物質は、例えば抗体や抗原等である。これら免疫学的に活性な物質と本発明の担体の結合は、例えば共通結合による場合はポリリジンのアミノ基と、Fab'化

50

抗体の-SH基やS-アセチル無水コハク酸等を用いて、抗体に導入された-SH基を、公知の二価反応性試薬等を用いて結合させれば良い。二価反応性試薬としては、例えば、*Succinimidyl-4-(N-Maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate*、*Sulfosuccinimidyl-4-(N-Maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate*、*m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide Ester*、*m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysulfosuccinimide Ester*等を例示できるが、特にこれらに限定されるものではない。また結合方法自体は、例えば酵素免疫測定法（石川栄治、河合忠、宮井潔ら編集、医学書院第3版）に記載された方法に従うことができる。

【0014】以上のように調製した、免疫学的に活性な物質を結合した担体を、例えば標識物質等に代表される免疫測定に必要な他の成分と共に適当な容量の容器に凍結乾燥状態に封入すること等で本発明の免疫測定用の試薬キットを得ることができ、任意の大きさ、形状の不溶性担体の表面に共有又は非共有結合により結合したポリリジンを介して免疫学的に活性な物質が結合されている免疫測定用担体を使用する本発明の免疫測定法を迅速、簡便に実施することができる。

【0015】

【発明の効果】本発明では、免疫反応における目的生成物である免疫複合体に関係なく標識物質が直接担体に結合するいわゆる非特異的結合に対し、担体にまず、ポリリジンを結合させて担体表面を覆うことによりその表面の性質を容易にかつ簡便に改良し、非特異的吸着を起こす性質を減少できる。よって、本発明は高い感度を必要とし、より高い再現性を求められる免疫測定において有効である。

【0016】本発明は、任意の大きさ、形状の担体を提供するものである。本発明の免疫測定用担体は、例えば抗体を担体に固定化して抗原を測定する競合法やサンドイッチ法等の免疫測定に使用でき、臨床的に現在用いられている生体試料の微量測定法に広く応用することができる。また担体の化学的性質を変化させることなく表面処理することによってのみその表面を改善するので、安価、簡便で、かつ効率的である。

【0017】

【実施例】以下、本発明を実施例により詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【0018】実施例1

ウォーターストランド法により得た平均直径1.4mm、平均長さ1.5mmのエチレン-酢酸ビニル共重合体(EVA)

ペレット（東ソー（株）製）を特願昭61-38279号に記載された方法に従って真球化し、フェライト（東ソー（株）製）を熱融着させ、更にグリシジルメタクリレート(GMA)でコートし、更に苛性ソーダ/メタノール溶液により表面層のエポキシ基を開環させてジオールにしたものを持体として以下の操作に使用した。

【0019】担体2000個に0.5mg/mlのポリリジン（シグマP-1274）の水溶液を5ml加えて37°Cのインキュベータで3時間インキュベートした。さらに、これらの担体のうち約1000個は、別途0.5%BSAを含むトリス緩衝液(pH 8.0)を加えて室温下で16時間インキュベートするブロッキング操作を行った。

【0020】比較のため、ポリリジンを結合させる操作を行わず、BSAブロッキングのみを行った担体及び何の処理も行っていない担体を準備した。

【0021】以上のようにして製造した本発明の担体と比較担体を用いて、標識物質の担体への非特異的吸着を測定した。まず、担体又は比較担体12個を容器に入れ、各々に標識物質であるアルカリ性ホスファターゼで標識したマウス抗インシュリン抗体（標識抗体）を100μl加えて、37°Cで40分間免疫反応を行わせた後、リン酸緩衝液(pH 7.4)で容器及び担体を洗浄して遊離物を除去し、抗原非存在下での標識抗体の担体への非特異的吸着を以下の基質で測定した。

【0022】アルカリ性ホスファターゼの基質として1mMの4-メチルウンベリフェロン溶液(pH 10)を、37°C条件下で100μl加え、10分間反応させた後、2.9mlの酵素反応停止液を加えて酵素反応を停止させ、励起波長360nm、蛍光波長450nmで蛍光測定を行った。

【0023】その結果、担体に吸着した標識物質中の酵素（アルカリ性ホスファターゼ）により生成した4-メチルウンベリフェロン(4MU)の濃度は、未処理担体では19.4nMであったのに対し、ポリリジン被覆担体では12.4nMに減少した。またBSAブロッキングのみを行った担体では0.7nMであったのに対し、BSAブロッキングを行ったポリリジン被覆担体では0.4nMであった。

【0024】この結果から、担体にポリリジンを結合させることにより、非特異的吸着の低い担体が得られることが分かる。未処理に比べポリリジン被覆とBSAブロッキング処理を行ったものは約49倍、BSAブロッキング処理のみを行った場合に比べポリリジン被覆とBSAブロッキング処理を行ったものは約2倍も非特異的吸着は低い。また、ポリリジン被覆だけでも未処理に比べ約1.6倍非特異的吸着は低い。